

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-158189

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月16日

(51) Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/00	ACK	A 6 1 K 37/02	ACK
	ADZ		7/16
	AGZ	A 2 3 G 3/00	1 0 1
			3/30
7/16		A 6 1 K 37/02	ADZ
// A 2 3 G 3/00	1 0 1		

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-336349

(22) 出願日 平成8年(1996)12月2日

(71) 出願人 000006769

ライオン株式会社

東京都墨田区本所1丁目3番7号

(72) 発明者 佐々木 修二

東京都墨田区本所1丁目3番7号 ライオン株式会社内

(74) 代理人 弁理士 小島 隆司 (外1名)

(54) 【発明の名称】 抗内毒素剤及び口腔用組成物

(57) 【要約】

【解決手段】 リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンを含むペプチドを有効成分とする抗内毒素剤。

【効果】 本発明の抗内毒素剤及びこれを配合した口腔用組成物は、優れた細菌内毒素活性抑制作用を有する上、長期間使用しても安全で、しかも細菌の歯牙、粘膜に対する付着抑制効果を有し、歯周疾患の予防、治療に適用可能である。また、本発明の抗内毒素剤は、細菌感染によるエンドトキシンショックの治療にも有効である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンを含むペプチドを有効成分とする抗内毒素剤。

【請求項2】 ペプチドが更にフェニルアラニン及びメチオニンを含む請求項1記載の抗内毒素剤。

【請求項3】 ペプチドが更にヒスチジン、アロリン、スレオニン、システイン、バリン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、アラニン及びアスパラギン酸を含むものである請求項1記載の抗内毒素剤。

【請求項4】 請求項1、2又は3記載の抗内毒素剤を含有する口腔用組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、歯周病細菌内毒素を中和し、かつ歯周病原菌の付着を抑制することができるほか、細菌感染によるエンドトキシンショックの治療にも有効な抗内毒素剤、及びこれを配合した口腔用組成物に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】歯周疾患の病原因子としては、付着因子（線毛、レクチン様リガンド）、内毒素、組織破壊性酵素（コラゲナーゼ、トリプシン様酵素）、白血球抵抗因子（莢膜、スーパーオキシドデスムターゼ、ロイコトリエン）及び細胞毒性代謝物（硫化水素、脂肪酸）などがある。なかでも細菌内毒素は、直接あるいは間接的に歯周組織に対して炎症を惹起したり、歯槽骨吸収を促進したりすることが確認されている。

【0003】従来、内毒素の関与する歯周疾患の予防、治療の提案としては、マクロライド系抗生物質による歯周組織再生の前処置剤（特開平7-267867号公報）、オクタデシルアロピルジメチルアンモニウム固定の水不溶性固体による内毒素吸着除去剤（特開平8-26954号公報）がある。しかし、これらを歯周疾患の予防、治療に応用するには、耐性菌の出現、副作用、歯牙へのステイン付着の問題等があり、この点の解決が望まれる。

【0004】本発明は、上記要望に応えるためになされたもので、優れた細菌内毒素活性抑制作用を有する上、長期間使用しても安全でしかもペプチドの保有する細菌の歯牙、粘膜に対する付着抑制も期待でき、歯周疾患の予防、治療に応用可能な抗内毒素剤及びこれを配合した口腔用組成物を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段及び発明の実施の形態】本発明者は、上記目的を達成するため鋭意研究を重ねた結果、リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンを含むペプチドが、インビトロ細菌内毒素活性抑制試験（エンドスペー法）で内毒素活性を抑制すること、家兎皮内毒性試験による内毒素活性抑制試験で発赤、腫脹、出

血性壊死を抑制すること、更に、ホルフィロモナス・ジンジバリス等の歯周病原菌の付着を抑制するなど、優れた抗内毒素効果を有し、上記ペプチドが抗内毒素の有効成分として有用であると共に、特に歯周病細菌内毒素を中和し、かつ歯周病原菌の付着を抑制する効果を奏することから口腔用組成物の歯周病細菌内毒素中和及び歯周病細菌付着抑制のための有効成分として効果的に用いられることを知見し、本発明をなすに至ったものである。

【0006】従って、本発明は、（1）リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンを含むペプチドを有効成分とする抗内毒素剤、及び（2）この抗内毒素剤を含有する口腔用組成物を提供する。

【0007】以下、本発明につき更に詳述する。本発明の抗内毒素剤は、上述したように、リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンを含むペプチドを有効成分とするものである。この場合、ペプチドはこれらのアミノ酸を含めばよく、上記アミノ酸の配列順序は特に制限はなく、上記アミノ酸の間に他のアミノ酸が介在したものであってもよいが、特に、リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンに加えて更にフェニルアラニン及びメチオニンを含むものが好適であり、とりわけこれらが Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met

又は

Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met

の配列順序のアミノ酸群を含むものが好適である。また、リジン、イソロイシン、グリシン及びロイシンに加えて更にヒスチジン、アロリン、スレオニン、システイン、バリン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、アラニン及びアスパラギン酸の1種又は2種以上、特に7～12種を含むものが好適である。

【0008】また、上記ペプチドは、上記アミノ酸を含む構成アミノ酸数は6～20個であることが好ましい。

【0009】上記ペプチドとしては、

ペプチドI: Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>

ペプチドII: Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met-NH<sub>2</sub>

ペプチドIII: Ile-His-Pro-Thr-Ile-Leu-Cys-Val-Tyr-Gly-Lys-Leu-Gln-Lys-Asn-Gly-Ala-Asp-Leu-Ala

を好ましい例としてあげることができる。

【0010】本発明にかかるペプチドは、口腔用組成物に配合して使用されるほか、これを抗内毒素剤としてそのまま経口的使用に供してもよいが、1種以上の医薬的に許容される医薬補助剤と組み合わせた経口医薬組成物又は非経口医薬組成物として使用してもよい。

【0011】上記経口医薬組成物の形態としては、錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆

## 3

時剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）等の固形製剤及び懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤等の液状製剤が挙げられる。このような組成物は、公知の方法によって製造することができ、この種の組成物の製造に通常用いられる担体、賦形剤を配合して調製し得る。

【0012】固形製剤とする場合は、慣用の賦形剤（無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乳糖、コーンスターチ、結晶セルロース等）、結合剤（カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等）、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク等）、崩壊剤（デンプン、カルボキシメチルセルロースカルシウム等）、その他矯味剤、甘味剤及び着色剤等を含有することができる。

【0013】液状製剤とする場合は、水性もしくは油性の懸濁液、溶液又はシロップ等とすればよく、また使用に際して適当なビヒクルで再溶解し得る乾燥物であってもよい。このような液状製剤は、普通に用いられる乳化剤（レシチン、ソルビタンモノオレエート等）、乳化助剤（ソルビットシロップ、メチルセルロース、ゼラチン等）、非水性ビヒクル（ココナツ油、落花生油等）、その他酸化防止剤、着色剤及び香料等を含有することができる。

【0014】上記非経口医薬組成物の形態としては、注射剤、筋肉注射剤又は点滴注射剤、軟膏剤、ゲル剤、坐剤等が挙げられる。このような注射剤は、公知の方法、即ち上記ペプチドを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁又は乳化することによって製造することができる。注射用の水溶液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助液を含む等張液等が挙げられ、必要に応じて適当な懸濁化剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、非イオン性活性剤等を併用してもよい。調製された注射液は、通常適当なアンブルに充填して用いることができる。

【0015】ペプチドの投与量は、投与方法、投与回数及び患者の年齢、体重及び性別に応じて適宜増減されるが、通常、成人1日当たり0.001~10g、特に0.01~5gの範囲となることが好ましい。ペプチドの投与は、1日の投与量が上記範囲内となるように1日に1回~数回投与すると好適である。

【0016】本発明の口腔用組成物は、上記ペプチドを含有するものであるが、その配合量は組成物全体の0.001~5%（重量%、以下同様）、特に0.01~3%とすることが好ましい。

【0017】本発明の口腔用組成物は、練歯磨、液状歯磨等の歯磨類、洗口剤、口腔用軟膏、うがい用錠剤、トローチ、キャンディ、チューインガムなどとして調製されるが、これら口腔用組成物を調製する場合、その種類に応じて通常使用されている成分を用いることができ、これらの成分の添加量は、本発明の効果を妨げない範囲で通常量とすることができる。

## 4

【0018】例えば、歯磨類の場合は、研磨剤、粘結剤、粘潤剤、界面活性剤、甘味剤、防腐剤、香料、着色剤、上記以外の各種有効成分などを配合し得、これら成分を水と混合して製造することができる。

【0019】ここで研磨剤としては、沈降性シリカ、シリカゲル、アルミノシリケート、ジルコノシリケート等のシリカ系研磨剤、第2リン酸カルシウム2水和物及び無水和物、ピロリン酸カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化アルミニウム、アルミナ、炭酸マグネシウム、第3リン酸マグネシウム、ゼオライト、ケイ酸ジルコニウム、合成樹脂系研磨剤などが好適に用いられる。

【0020】粘結剤としては、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、キサンタンガム、カーボボール、グアガム、モンモリロナイト、ゼラチンなどが好適に用いられる。

【0021】粘潤剤としては、グリセリン、ソルビット、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、キシリット、マルチット、ラクチットなどが好適に用いられる。

【0022】界面活性剤としては、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤等を配合し得、具体的にはラウリル硫酸ナトリウム、 $\alpha$ -オレフィンスルホン酸ナトリウム、N-アシルサルコシネート、N-アシルグルタメート、2-アルキル-N-カルボキシメチル-N-ヒドロキシエチルイミダゾリニウムベタイン、N-アシルタウレート、ショ糖脂肪酸エステル、アルキロールアמיד、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プルロニック、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレートなどが好適に用いられる。

【0023】甘味剤としては、サッカリンナトリウム、ステビオサイド、ステビアエキス、パラメトキシシンナミックアルデヒド、ネオヘスペリジルジヒドロカルコン、ペリラルチンなどが挙げられる。

【0024】防腐剤としては、パラオキシ安息香酸エステル、安息香酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0025】香料としては、1-メントール、カルボン、アネオール、リモネン等のテルペン類又はその誘導体などが好適である。

【0026】着色剤としては、青色1号、黄色4号、二酸化チタンなどが好適である。

【0027】各種有効成分としては、フッ化ナトリウム、フッ化カリウム、フッ化アンモニウム、フッ化第1スズ、モノフルオロリン酸ナトリウムなどのフッ化物、正リン酸のカルシウム塩、ナトリウム塩等の水溶性リン化合物、アラントインタロルヒドロキシアリミニウム、ヒノキチオール、アスコルビン酸、塩化リゾチム、グリチルリチン酸及びその塩類、塩化ナトリウム、トラネキサム酸、イブシロンアミノカプロン酸、酢酸d1-ト

コフェロール、アズレン、グリチルレチン酸、銅クロロ  
 ワリナトリウム、グルコン酸銅等の銅化合物、乳酸  
 アルミニウム、塩化ストロンチウム、硝酸カリウム、ペ  
 ルベリン、ヒドロキサム酸及びその誘導体、トリポリリ  
 ン酸ナトリウム、ゼオライト、デキストラナーゼ、ムタ  
 ナーゼ、アミラーゼ、メトキシエチレン、無水マレイン  
 酸共重合体、ポリビニルピロリドン、エビジヒドロコレ  
 ステリン、ジヒドロコレステロール、クエン酸亜鉛、ト  
 ウキ、オウバク、チョウジ、ローズマリー、オウゴン、  
 ペニバサなどの抽出物、 $\alpha$ -ビサボロール、クロルヘキ  
 シジン塩類、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンゼトニ  
 ウム、トリクロロカルバニリドなどが挙げられる。

【0028】

【発明の効果】本発明の抗内毒素剤及びこれを配合した  
 口腔用組成物は、優れた細菌内毒素活性抑制作用を有す  
 る上、長期間使用しても安全で、しかも細菌の歯牙、粘  
 膜に対する付着抑制効果を有し、歯周疾患の予防、治療  
 に応用可能である。また、本発明の抗内毒素剤は、細菌  
 感染によるエンドトキシンショックの治療にも有効である。

【0029】

【実施例】以下、実験例と実施例を示し、本発明を具体  
 的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるも  
 のではない。

【0030】なお、下記例で、ペプチドI、ペプチドI  
 I、ペプチドIIIは下記の通りである。

ペプチドI: Lys-Phe-Ile-Gly-Leu  
 -Met-NH<sub>2</sub>

ペプチドII: Lys-Leu-Phe-Gly-Ile  
 -Met-NH<sub>2</sub>

ペプチドIII: Ile-His-Pro-Thr-I  
 le-Leu-Cys-Val-Tyr-Gly-Ly  
 s-Leu-Gln-Lys-Asn-Gly-Ala  
 -Asp-Leu-Ala

【0031】〔実験例1〕 インビトロ内毒素活性抑制  
 試験

エンドスペー法（生化学工業（株））を変法した下記  
 方法により、内毒素活性抑制試験を行った。歯周病の原  
 因菌の1つであるアクチノバシルス・アクチノマイセテ  
 ムコミタンスY4又はボルフィロモナス・ジンジバリス  
 381の内毒素（以下、A. a. LPS、P. g. LP

Sと記す）の1 $\mu$ g/mlと各種薬剤（1 $\times 10^{-4}$ M）  
 の1mlとを37℃、30分間インキュベーション後、  
 A. a. LPS又はP. g. LPSが100pg/ml  
 になるように希釈して、エンドスペーによる内毒素活  
 性抑制を評価した。結果を表1、2に示す。

【0032】

【表1】

A. a. LPS活性抑制

検体	ABS <sub>490nm</sub>	抑制率 (%)
蒸留水	0.24	—
A. a. LPS	0.62	—
A. a. LPS + ペプチドI	0.36	68.4
A. a. LPS + ペプチドII	0.41	55.3
A. a. LPS + ペプチドIII	0.23	100.0

【0033】

【表2】

P. g. LPS活性抑制

検体	ABS <sub>490nm</sub>	抑制率 (%)
蒸留水	0.18	—
P. g. LPS	0.90	—
P. g. LPS + ペプチドI	0.49	56.9
P. g. LPS + ペプチドII	0.53	51.4
P. g. LPS + ペプチドIII	0.55	48.6

【0034】〔実験例2〕 家兎皮内毒性試験による内  
 毒素活性抑制試験

① Primary skin reaction

家兎腹部皮内に内毒素又は内毒素とペプチドの混合液  
 （注射前に37℃、30分間反応）を0.1ml注射し  
 た。48時間後に注射部位の発赤、腫脹の大きさ（縦×  
 横）を測定して、内毒素活性抑制を評価した。結果を表  
 3に示す。

【0035】

【表3】

検体	発赤、腫脹の大きさ
A.a.LPS (100 $\mu$ g)	32 $\times$ 34mm 30 $\times$ 32mm (AV. 1024mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドI (1000 $\mu$ g)	13 $\times$ 14mm 15 $\times$ 16mm (AV. 211mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドII (1000 $\mu$ g)	15 $\times$ 16mm 14 $\times$ 16mm (AV. 232mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドIII (1000 $\mu$ g)	14 $\times$ 15mm 13 $\times$ 16mm (AV. 209mm <sup>2</sup> )

【0036】②局所シュワルツマン反応  
(Local Schwarzman reaction)

Primary skin reaction判定後、  
家兎耳静脈にA. a. LPS 100  $\mu$ g/kg (体重) \*

\*注射し、24時間後に皮内注射部位の紅斑、出血性壊死  
の大きさ(縦 $\times$ 横)を測定することで内毒素活性抑制を  
評価した。結果を表4に示す。

【0037】

【表4】

検体	紅斑、出血性壊死の大きさ
A.a.LPS (100 $\mu$ g)	17 $\times$ 20mm 20 $\times$ 24mm (AV. 410mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドI (1000 $\mu$ g)	8 $\times$ 9mm 7 $\times$ 10mm (AV. 71mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドII (1000 $\mu$ g)	11 $\times$ 13mm 10 $\times$ 14mm (AV. 142mm <sup>2</sup> )
A.a.LPS (100 $\mu$ g) +ペプチドIII (1000 $\mu$ g)	4 $\times$ 5mm 5 $\times$ 6mm (AV. 25mm <sup>2</sup> )

【0038】〔実験例3〕 ポルフィロモナス・ジンジバリス (P. g.) 381の付着抑制実験

トリチュウムをラベルしたP. g. 381 (1.2  $\times$  10<sup>8</sup> cells) とヒト唾液処理したハイドロオキシアパタイトビーズ2mg及びペプチド100  $\mu$ gをKC1緩衝液400  $\mu$ l中、室温で1時間反応させた。インキュベーション後、ハイドロオキシアパタイトビーズに吸着した菌を吸着しない細菌を分離するために100%プロパノールで処理した。P. g. 吸着したハイドロオキシアパタイトビーズをKC1緩衝液で洗浄後、放射活性を測定して、ペプチドの付着阻害率を求めた。結果※50

40※を表5に示す。

【0039】

【表5】

	P.g.菌付着阻害率 (%)
ペプチドI	84
ペプチドII	70
ペプチドIII	96

【0040】〔実験例4〕薬剤の副作用に関して、ラッ

トを用いた試験を行った。ラット(雄, 8週齢)を一群  
10匹として三群用意し、各群にペプチドI, II, I  
IIを1日当り50mg/kgをそれぞれ経口投与し、\*

\*10日間各ラットの生死を観察したが、死亡例はなく、  
各ペプチドの副作用は認められなかった。

【0041】以下、実施例を示す。

〔実施例1〕 練歯磨

炭酸カルシウム	50.00 %
グリセリン	20.00
カラギーナン	0.50
カルボキシメチルセルロース	1.00
ラウリルジエタノールアマイド	1.00
ショ糖モノラウレート	2.00
香料	1.00
サッカリン	0.10
Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	0.80
水	残
計	100.00 %

【0042】

〔実施例2〕 液状歯磨

水酸化アルミニウム	25.00 %
グリセリン	40.00
ソルビット	15.00
カルボキシメチルセルロース	0.20
プロピレングリコール	2.00
ラウリル硫酸ナトリウム	1.50
モノラウリン酸デカグリセリル	1.00
香料	1.00
サッカリンナトリウム	0.10
Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met-NH <sub>2</sub>	0.20
水	残
計	100.00 %

【0043】

30

〔実施例3〕 口腔用軟膏

流動パラフィン	15.00 %
セタノール	10.00
グリセリン	20.00
ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル	5.00
香料	0.50
サッカリンナトリウム	0.10
Ile-His-Pro-Thr-Ile-Leu-Cys-	
Val-Tyr-Gly-Lys-Leu-Gln-Lys-	
Asn-Gly-Ala-Asp-Leu-Ala	0.50
水	残
計	100.00 %

【0044】

〔実施例4〕 洗口液

エタノール	20.00 %
香料	1.00
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.30
モノフルオリン酸ナトリウム	0.10
サッカリンナトリウム	0.05
Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met-NH <sub>2</sub>	0.70

11

水	残	
計	100.00	%

【0045】

〔実施例5〕 うがい用錠剤

炭酸水素ナトリウム	54.50	%
クエン酸	17.00	
無水硫酸ナトリウム	12.80	
第2リン酸ナトリウム	10.00	
ポリエチレングリコール	3.00	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0.10	
香料	2.00	
オレイン酸	0.10	
Ile-His-Pro-Thr-Ile-Leu-Cys- Val-Tyr-Gly-Lys-Leu-Gln-Lys- Asn-Gly-Ala-Asp-Leu-Ala	0.50	
計	100.00	%

【0046】

〔実施例6〕 トローチ

ブドウ糖	35.00	%
バラチノース	35.00	
アラビアゴム	6.00	
香料	1.00	
Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met-NH <sub>2</sub>	0.50	
水	残	
計	100.00	%

【0047】

〔実施例7〕 キャンディ

砂糖	50.00	%
水飴	33.00	
有機酸	2.00	
香料	0.20	
Lys-Leu-Phe-Gly-Ile-Met-NH <sub>2</sub>	1.00	
水	残	
計	100.00	%

【0048】

〔実施例8〕 チューインガム

砂糖	53.00	%
ガムベース	20.00	
グルコース	10.00	
水飴	16.00	
香料	0.50	
Lys-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH <sub>2</sub>	0.50	
計	100.00	%

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

A23G 3/30

識別記号

FI

A61K 37/02

AGZ